

University of Groningen

Adipose derived stromal cells in cardiovascular regenerative medicine

Przybyt, Ewa

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Przybyt, E. (2016). *Adipose derived stromal cells in cardiovascular regenerative medicine*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

APPENDIX I

Nederlandse samenvatting (Summary in Dutch)

Hart- en vaatziekten, zoals myocardinfarcten (MI), oftewel hartaanvallen, zijn de belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd en veroorzaken 30% van de totale jaarlijkse sterfte (www.heartstats.org, www.who.org). De meeste gepubliceerde post-MI interventiestudies zijn gericht op het verbeteren van de doorbloeding (perfusie), het verminderen van apoptose (celdood) en onderdrukking van sterke ontstekingsreacties. Deze laatste twee benaderingen zijn vrijwel uitsluitend farmacologisch van aard en kunnen helaas niet voorkomen dat hartspierschade ontstaat, maar induceren ook geen regeneratieve, weefselherstellende processen. Ter compensatie van het verlies van cardiale massa is het essentieel om een nieuwe bron van cardiomyocyten (hartspiercellen) aan te boren, alsmede post-MI de perfusie en *weefselremodeling* te verbeteren, opdat de toename van verbindweefseling na een hartaanval beperkt blijft. Vroege interventies na MI zoals dotteren en het plaatsen van stents, hebben de overleving aanzienlijk verbeterd, met name doordat de perfusie hersteld wordt. Ook het plaatsen van omleidingen, *bypass grafts*, heeft de sterfte aanzienlijk gereduceerd. Echter, het aantal patiënten dat hartfalen ontwikkeld (50% 5 jaarsoverleving) is hierdoor juist sterk toegenomen na een infarct. Dit betekent, dat er nog steeds een sterke noodzaak bestaat voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën, die uiteindelijk leiden tot regeneratie van de beschadigde hartspier. De belangrijkste voorwaarde hiervoor is, zoals hierboven gememoreerd, nieuwvorming van de spierwand oftewel aanvulling van de verloren cardiomyocyten. Dit zou de negatieve *remodelling* (weefselherbouw) en *verbindweefseling* voorkomen en hierdoor ook hartfalen tegengaan.

Therapie op basis van mesenchymale stamcellen uit vetweefsel.

Stamcellen worden als ‘veelbelovende’ spelers gezien in de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden van diverse orgaanziekten, inclusief hart- en vaatziekten. Een bijzonder type stamcel, de zg. mesenchymale stamcel, komt voor in vrijwel alle organen van het lichaam, maar is het best bestudeerd vanuit beenmerg (BM-MSC) of vanuit vet (adipoos) weefsel (ADSC) [1]. De isolatie van therapeutische cellen uit lipoaspiraten na een liposuctie procedure is minder invasief en minder pijnlijk in vergelijking met de beenmergpunctie. Daarnaast kunnen cellen worden verkregen bij de klinisch relevante getallen of snel worden opgeschaald door kweken *in vitro*. Recente publicaties van experimentele klinische studies met intracoronaire, dwz via een kransslagader, infusie van lichaamseigen ADSC geven aan dat de procedure veilig is, de hartfunctie enigszins verbetert, vooral de perfusie en *remodeling* verbeteren [2]. Hoewel klinische en preklinische onderzoeken naar de veiligheid en efficiëntie van therapie met ADSC voor cardiale regeneratie een consistent beeld geeft, zijn de mechanismen waardoor ADSC hartschade herstellen nog lang niet begrepen [3,4]. Dit proefschrift heeft tot doel de regeneratieve potentieel van ADSC verder te ontleden onder de pro - inflammatoire en hypoxische (zuurstofarme) omstandigheden zoals die zich voordoen na acute MI. Verder hebben we de ADSC geleide stimulatie van cardiomyocyt proliferatie, organisatie en rijping onderzocht (deel I). Ons onderzoek laat zien dat het voorbehandelen van ADSC *in vitro*, bijvoorbeeld door blootstelling aan hypoxie of biochemische prikkeling met ontstekingsfactoren (zoals IL-1 β), de regeneratieve capaciteit van ADSC versterkt. Deze versterking wordt gemedieerd door de (verhoogde) uitscheiding van zg. paracrine factoren die regeneratie bevorderen. Het cytokine IL-6 is een van deze uitgescheiden factoren en verhoogd de delingssnelheid van hartspiercellen. Het cytokine IL-6 activeert twee belangrijke signaaltransductieroutes nl. de zg *Janus Kinase Signal Transducer and*

Activator of Transcription (JAK/STAT) en de *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) routes. Als cardiomyocyten worden gekweekt, samen met ADSC, op de bindweefselfactoren (extracellulaire matrix, ECM) die door ADSC wordt uitgescheiden en neergelegd, dan versterkt dit de oriëntatie van deze spiercellen (nl in de contractierichting), als ook de elektrische koppeling (connexines) alsmede de rijping van de contractiele machinerie (sarcomeren). Daarenboven, is de deling vergroot en de averechtse hypertrofie (te sterke vergroting van het celvolume) verminderd. De therapeutische toepassing van ADSC en ECM zou met andere woorden kunnen worden toegepast om myocardconstructen te *tissue-engineeren* en ook door directe toepassing in het hart de post-myocardinfarct weefselremodelling kunnen verbeteren.

In deel II bestuderen we de ADSC-gemedieerde vasculaire netwerkvorming, waarin ADSC pericyt functie overnemen en vasculaire netwerken stabiliseren. Pericyten zijn gladde spierachtige cellen, die rond de kleinste bloedvaten (capillairen) zijn genesteld en deze vaatjes 'besturen'. Onze *in vitro* resultaten tonen dat ADSC de vorming van capillaire netwerken uit endotheelcellen ondersteunen. Deze capillairen worden ieder door een endotheelcel gevormd. Echter, ADSC doen meer, ze bevorderen nl. ook de vorming van meercellige bloedvatstructuren, die tevens door ADSC worden gestabiliseerd doordat ze hierin integreren. Deze *in vitro* bevindingen konden worden gevalideerd in een neonataal retinopathie muismodel, waarin ADSC na intraoculaire (in het oog) toediening werden enerzijds de pathologische vaatvorming beïnvloedden en anderszijds integreerden op pericytaire locaties. Dit suggereert sterk dat ADSC pericyten kunnen vervangen in retinopathie. Deze verbetering ging gepaard met veranderingen in het genexpressie patroon van de retinas: Ang-1, FGF-2, TNF α en IL-8 namen toe, terwijl het vaatdestabiliserende Ang-2 afnam. In retinopathie spelen zowel hypoxie als ontsteking een rol. *In vitro*, kon het effect van retinopathie deels worden herleid naar veranderende genexpressie van ADSC onder hypoxie en ontsteking: net als *in vivo* nam de expressie van Ang-1, FGF-2 en VEGF-A toe. Ook deze waarnemingen ondersteunen de gedachte dat ADSC van therapeutisch nut kunnen zijn bij ziekten met een verstoorde angiogenese, in het bijzonder vanwege hun zg. juxtacriene interactie met nieuwgevormde vaatjes als pericyten. Een andere belangrijk resultaat van onze studies is, dat naast de genoemde juxtacriene interacties, door ADSC geconditioneerd kweekmedium ook de vorming van capillaire netwerken (*sprouting* en vorming van bloedvatachtige netwerken) kon bewerkstelligen maw via paracriene stimulering. Dit was het sterkst onder de omstandigheden zoals die na een acuut hartinfarct worden aangetroffen, maw hypoxisch en sterk inflammatoir spierweefsel. De *in vitro* door hypoxie en ontstekingsfactoren (IL-1 β) gestimuleerde ADSC, produceerden factoren die het aantal vertakkingen, de taklengte zowel als de migratie van endotheelcellen sterk stimuleren. Deze eigenschap was uniek voor ADSC, want andere typen mesenchym- / fibroblastachtige cellen zoals muis 3T3, humane dermale fibroblasten (HDF) en humane cardiale fibroblasten (HCF) waren niet in staat de vorming van bloedvatachtige netwerken te ondersteunen. Dit was terug te voeren op de verhoogde expressie van VEGF en FGF-2 in ADSC. Echter, was er ook een opregulatie van pro-migratoire (MCP-1 en IL-8) en pro-inflammatoire (IL-1 β en IL-6) in ADSC. Een andere interessante, maar tot dusver onbegrepen, bevinding is dat bloedvatachtige netwerken nadat ze eenmaal zijn gevormd onder stimulering van ADSC, na trypsinisering (het losmaken van de bodem van het kweekschachtje) ook weer snel(er) nieuwe netwerken vormen. Dit zou therapeutisch toegepast kunnen worden bij ziekten waar een verhoogde doorbloeding is gewenst. Te denken valt aan toediening van dergelijk bloedvatnetwerken in biodegradeerbare injecteerbare gels.

Tenslotte hebben we de toepassingen van ADSC voor toekomstige wondgenezing en littekenvorming in de huid onderzocht. Het is bekend dat toediening van de zogenaamde lipoaspiraten huidlittekens kan verminderen. De logische gedachte is dat dit (mede)veroorzaakt wordt door ADSC. We hebben laten zien dat geconditioneerd kweekmedium van ADSC, de vorming van littekenfibroblasten (zg. myofibroblasten) uit TGFβ-gestimuleerde huidfibroblasten kan voorkomen. Sterker nog, ook het gedrag van bestaande littekenfibroblasten, zg keloïde fibroblasten, kon worden ‘verbeterd’: hun contractie, alsmede de uitstoot van extracellulaire matrix werd gereduceerd door ADSC-geconditioneerd medium. Samengevat, suggereert dit een veelbelovende toepassing voor ADSC in de behandeling van bindweefsel/littekenvorming, ook in het hart na een infarct.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift, heeft de kennis vergroot van ADSC en hun therapeutisch werkingsmechanismen na een hartaanval. In het bijzonder hebben we beschreven dat ADSC onder invloed van de doorgaans als averechts beschouwde post-myocardinfarctmilieu (hypoxie en ontsteking), juist beter anti-inflammatoir functioneren. Dit, door verhoogde aanmaak en uitscheiding van factoren die cardiomyocyten-deling bevorderen. Deze tevens de bloedvatvorming versterken en ondersteunen en de extracellulaire matrix verbeteren. Ook de potentie voor onderdrukking van verlittekening door ADSC is duidelijk vastgesteld. Wij veronderstellen dat het gebruik van ADSC of uitgescheiden componenten zoals groeifactoren of extracellulaire matrix componenten een haalbare en klinisch relevante toepassing is voor de behandeling van de complicaties van hartaanvallen, d.w.z. zeggen voor de reductie van hartfalen.

References:

- [1] Atsma DE, Fibbe WE, Rabelink TJ: Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair. *Curr Opin Lipidol* 2007, 18:645-649.
- [2] Panfilov IA, de Jong R, Takashima S, Duckers HJ: Clinical study using adipose-derived mesenchymal-like stem cells in acute myocardial infarction and heart failure. *Methods Mol Biol* 2013, 1036:207-212.
- [3] Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, Geleijnse ML, Fernandez-Aviles F, Zijlstra F, Serruys PW, Duckers HJ: First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012, 59:539-540.
- [4] Houtgraaf JH, de Jong R, Kazemi K, de Groot D, van der Spoel TI, Arslan F, Hoefer IE, Pasterkamp G, Itescu S, Geleijnse M, Zijlstra F, Serruys PW, Duckers HJ: Intracoronary Infusion of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells Directly Following Experimental Acute Myocardial Infarction Reduces Infarct Size, Abrogates Adverse Remodeling and Improves Cardiac Function. *Circ Res* 2013.

Curriculum vitae

The author of this dissertation, Ewa Przybyt, was born on 20 January 1983 in Kamienna Góra, Poland. In 2002 she completed her pre-university secondary education at High School in Kamienna Góra, Poland, specializing in biology and chemistry. She was then admitted to the Master of Science programme in Biology at the University of Wrocław, Poland (Department of General Zoology and Cell Biology). During her Master candidacy, Ewa participated in the Socrates Erasmus Scholarship program at the Department of Developmental Genetics at the University of Groningen, the Netherlands. Shortly thereafter in 2009, Ewa joined the Cardiovascular Regenerative Medicine Research Group (CAVAREM) at the University Medical Center Groningen. Her research was embedded within the TERM/SmartMix program (in collaboration with the Leiden University Medical Center) and focuses on cardiovascular regeneration using mesenchymal stem cells. Herein, she was investigating the role of Adipose Derived Stem Cells in the induction of cardiomyocyte proliferation in an in-vitro model of post-infarct microenvironment. Furthermore, she was collaborating in a research project focused on the pericyte-like behavior of ADSC and their role in neovascularization (collaboration with Mannheim University, Germany). In 2009 and 2010 she was awarded a Jan Kornelis de Cock Foundation grant (University of Groningen) on “The role of the post-myocardial (MI) microenvironment in stem cell guided cardiac regeneration” and Adipose Derived Stem Cells (ADSC) mediate vascular stabilization in therapeutic tissue repair”, respectively, to further her research.

List of publications

Ewa Przybyt, Martin C. Harmsen (2013). Mesenchymal Stem Cells: promising for myocardial regeneration? *Journal of Current Stem Cell Research and Therapy*.

Ewa Przybyt, Guido Krenning, Marja GL Brinker, Martin C. Harmsen (2013). Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate *in vitro* through STAT3 and Erk1/2. *Journal of Translational Medicine*

Frederick Pfister, Ewa Przybyt, Martin C. Harmsen, Hans-Peter Hammes (2013). Pericytes in the eye. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*

Ewa Przybyt, Frederick Pfister, Stephanie Busch, Marja van Luyn, Jeroen Kuipers, Guido Krenning, Hans-Peter Hammes, Martin C. Harmsen (2013) Adipose tissue-derived stromal cell (ADSC) restore pericyte loss in mouse retinopathy of prematurity. Under revision, *PLOS ONE*

Ewa Przybyt, Guido Krenning, Martin C. Harmsen (2013). Hypoxia and pro-inflammatory cytokines enhance the efficiency of Adipose Derived Stromal Cells-induced proliferation of HL-1 cardiomyocytes. Submitted

Maroesjka Spiekman, Ewa Przybyt, Berend van der Lei, Martin C. Harmsen (2014) Adipose-derived stem cells (ADSC) inhibit differentiation and maturation of human dermal fibroblasts (HDF) in a paracrine fashion: implications for scar formation. *Plastic and Reconstructive Surgery*

Ewa Przybyt, Marja. J.A. van Luyn, Martin C. Harmsen (2014) Extracellular matrix components of Adipose Derived Stromal Cells promote alignment, organization and maturation of cardiomyocytes *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*

Ewa Przybyt, Thijs Pasman, Guido Krenning, Martin C. Harmsen
ADSC promote vascular network formation through juxtacrine and paracrine interactions with endothelial cells. In preparation

Guidotti S, Meyer N, Przybyt E, Scheurink AJ, Harmsen MC, Garland T Jr, van Dijk G (2016). Diet-induced obesity resistance of adult female mice selectively bred for increased wheel-running behavior is reversed by single perinatal exposure to a high-energy diet. *Physiology & Behavior*

Acknowledgements

Whenever I think about beginning of my PhD at CAVAREM, I remember showing up very anxious for the interview with Marco and finding him smiling and very enthusiastic for my future project. Right away I felt, this is the correct time and place. PhD time was an enlightening experience both for my education, professional development as for my personal growth. Even though PhD might sometimes feel like “tilting at windmills”. The feeling of success would not be so great without obstacles. Finalizing this PhD thesis made me feel a huge sense of personal achievement. With these words I would like to acknowledge the help, effort and positive spirit of all who contributed to this success.

I would like to thank Prof. Martin Harmsen and Prof. Marja van Luyn for their supervision over the past years. Dear Marco, you have been a unique guide and an excellent mentor. I am very glad to have an opportunity to go through my PhD journey together with you. Thank you for all the exciting discussions and motivation for curiosity in science. I wish you a lot of satisfaction and joy in your work. Dear Marja, thank you for your bright and sharp inside into my work. I really appreciate your positive yet critical view. Thank you for your guidance and for beautiful TEM photos. I am thankful for your patience and effort in finalizing this thesis.

I would like to thank the Reading Committee: Prof. R.M.F. Berger, Prof. D.E. Atsma, Prof. H.-P. Hammes for taking the time and effort in evaluating my dissertation. I truly appreciate it. Dear Prof. D.E. Atsma thank you for our great collaboration and fruitful meetings within TERM/SmartMix program. Prof. H.-P. Hammes thank you for opening to me a door to the pericyte world. Thank you for giving me an opportunity to collaborate together with you and your team. I am grateful for invitation to perform experiments in your laboratory in Mannheim, which led to initiation of Part II of this thesis.

I would like to thank all people from the Medical Biology section of our Department, who provided their help and inspiration over the years.

I would also like to express my gratitude to my collaborators from Medical Faculty in Mannheim, Germany Prof. H.-P. Hammes, Frederick Pfister and Stephanie Busch. My especially warm thanks to Frederick to intrigue me to pursue investigation of the pericytic characteristic of ADSC. Thank you Frederick for your warm welcoming in Mannheim. I am looking forward for publishing of our work.

I would also like to thank you to my collaborators from Moscow State University Prof. Parfyonova and Dr. Anastasia Efimenko for giving me the exciting opportunity to exchange our views on function of ADSC. I appreciate your invitation of me and Marco to visit you in Moscow. It was an unforgettable experience.

Thank you to International Research Training Group, European Graduate College GRK880 Vascular Medicine, BMM Creating materials for life/ Translational excellence in regenerative Medicine) TeRM 6 and NVMB Nederlandse vereniging voor matrix biologie for giving me an opportunity broaden my scientific knowledge. Thank you to *Jan Kornelis de Cock Grant* Foundation for their financial contribution.

Dear CAVAREM members, you made my PhD time fun at work and after work. I am very grateful for the team spirit. Thank you for common supporting during the struggles and celebrating each little success. Dear Guido and Jan-Renier, I always admire you for your scientific success. You've been a great inspiration. Thank you both for your support and critical view of my work.

Dear Monika, I was always so happy to have you around. My Polish soul mate of UMCG. You have been always a huge support and great party mate. I wish you a lot of happiness and satisfaction.

Dear Mojtaba and Ghazaleh, thank you for sharing a room with me and making me laugh every day. I love to come back to the moment when you were teaching me Iranian dance and

got catch by Marco. We had so much fun that nobody could stop us☺ Thank you for being great friends and Ghazaleh for being my paranimfen. I wish you both all the best in your career and life!

Dear Vincenzo, I was so happy hearing you are going to be one of CAVAREM. Thank you for all the great moments we had in Groningen. I appreciate to have you close to me as my paranimfen (together with Ghazaleh) in this stressful moment. I wish you all the best with your PhD. Successo!

Dear Marike and Nina, work with you have been a true pleasure. Always positive and moving forward with your struggles. Your commitment to science has been an inspiration. Thank you for all great moments and for our Barcelona trip.

My great thanks to Ee Soo, Marja Brinker, Josee, Jasper, Linda, Hans van der Plas, Susan and Annete for always being helpful, patient and so positive!

Thanks to my students, Maroesjka and Thijs, teaching you have been a pleasure. I appreciate your effort which led to our common success. I am so happy to hear you are both continuing with your scientific carreer. Goed Bezig!

Dear moj Polisiu, Aska!!! You have always been the best! I am so grateful to the universe to bring you close to me☺ Thank you for being best friend!

My jaka!jaka!☺ Stefano, I am so happy to meet you and become true friends. I love our escape trips. You are and always will be a great inspiration for me. Thank you for all great moments!

Great thanks to the Bult Family☺ for helping me out in my early PhD life. You will always have a special space in my heart. I wish you a lot of happiness!

Dear Carlos, thank you for many evenings field with talking, drawing cells or sensors, laughing and listening to music☺ I wish you a lot of success in your career and personal life. Obrigada!

Dear Kuba, Iga, Antonia, Ananas and Madina, thank you for all your craziness. It was a pleasure to have you around.

I would like to express my gratitude to my family, all my friends in Poland and abroad. Great thanks to all Martinians for our amazing time together. „Na zdrowie!“

I would like to thank to Marco Pio Antonio Curatolo☺ for giving me love, patience, care and „un elefante and vigorsol“

To my parents and my brother Radek you are a foundation of this work. There are no words to describe my gratitude. I am privileged to have such an amazing family. This thesis is a proof of your great work and love you surrounded me with. Thank you for always being there.